

***Anaplasma marginale* EM NOVILHAS *Bos taurus* PRENHES E NÃO PRENHES: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS**

NATÁLIA MACHADO RAHAL^{1*}; GABRIELA BUENO LUZ^{2*}; MONIQUE TOMAZELE ROVANI³; MARCIO NUNES CORRÊA^{4*}

¹ Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – Brasil – rahal.natalia@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – Brasil – gabrielabluz.veterinaria@gmail.com

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre/RS – Brasil – mtrovani@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – Brasil – marcio.nunescorrea@gmail.com

*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)

1. INTRODUÇÃO

Falhas reprodutivas de fêmeas bovinas são problemas recorrentes dentro dos sistemas de produção. Perdas por morte embrionária precoce (até aproximadamente 30 dias de gestação) podem se dar por diversos fatores, dentre estes estão a falha no reconhecimento materno da gestação e a ocorrência de doenças (ABDALLA et al., 2017).

A rickettsia *Anaplasma marginale* faz parte do complexo de enfermidades infecciosas Tristeza Parasitária Bovina (TPB), sendo a anemia hemolítica o principal sinal clínico apresentado pelos hospedeiros deste parasita intraeritrocitário. A TPB pode representar aproximadamente 55% dos casos de enfermidades parasitárias em bovinos no Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 2017).

Além dos danos e perdas causados pela queda na produção e a morte de animais em consequência dessas doenças, são descritas desordens reprodutivas como abortos, repetição de estro, maior taxa de natimortos, nascimento de bezerros fracos e anestro (GIVENS E MARLEY, 2008). Entretanto, são necessários mais estudos que investiguem o efeito de *A. marginale* na fertilidade e concepção de fêmeas bovinas.

Dessa forma, objetivou-se realizar diagnóstico molecular de *A. marginale* em novilhas *Bos taurus* prenhes e não prenhes, submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e relacionar com parâmetros hematológicos.

2. METODOLOGIA

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Farroupilha (CEUA/IFFAR 5550010518). Noventa e duas novilhas da raça Aberdeen Angus (*Bos taurus*) criadas extensivamente em pastagem nativa no município de Charqueadas, RS, foram selecionadas previamente ao protocolo de sincronização de estro. Os critérios foram: idade (superior a dois anos); peso (65% do peso adulto); e escore de condição corporal ($ECC \geq 2,5$). Foi realizado um protocolo de sincronização e a inseminação foi realizada em tempo fixo no D11 do protocolo. No 34º dia após a inseminação foi realizado o diagnóstico de gestação (DG) através de ultrassonografia. A taxa de concepção foi calculada dividindo-se o total de vacas que ficaram prenhes pelo número total de vacas inseminadas no período.

No primeiro dia do protocolo (D0) foi realizada coleta de sangue por punção da veia coccígea com sistema de coleta à vácuo em tubo contendo EDTA. Uma alíquota de 1mL da amostra de sangue era destinada à extração de DNA (ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System - Promega, EUA). Os parâmetros de eritrócitos e hemoglobina foram avaliados utilizando analisador automático (BC-2800Vet, Mindray, Brasil). O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito. Realizou-se esfregaço sanguíneo e coloração por Panótico rápido para visualização e identificação dos hemoparasitas em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X). Para diagnóstico molecular foi realizada PCR quantitativa (qPCR - StepOnePlus™ System (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystem™) para o gene de interesse *msp5*. Em ambas as técnicas os animais foram classificados como positivos ou negativos para *A. marginale*.

Para as análises estatísticas as novilhas foram alocadas em dois grupos conforme o resultado do diagnóstico de gestação no D34 (Prenhes e Não-prenhes). Para comparações entre os grupos utilizou-se teste T e as análises foram realizadas no software SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Foi considerado significativo $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No diagnóstico de gestação, 45 das 92 novilhas estavam prenhes, obtendo a taxa de concepção de 48,91% e todos os animais foram negativos para todos os agentes infecciosos na avaliação do esfregaço sanguíneo. Entretanto, na qPCR todas as amostras amplificaram para o gene alvo *msp5* de *A. marginale*, sendo positivas para este agente no diagnóstico molecular. O *A. marginale* está disseminado pelos rebanhos bovinos, porém os dados de prevalência podem variar de acordo com a região do país e com a técnica utilizada para diagnóstico, mostrando-se mais alta em técnicas de maior sensibilidade como sorologia e diagnóstico molecular e mais baixa ao se utilizar a técnica de esfregaço sanguíneo (MARANA et al., 2009). Devido ao resultado positivo para a presença de *A. marginale* em todos os animais, não foi possível verificar a influência desta na taxa de concepção.

As médias dos parâmetros hematológicos não diferenciaram entre os grupos Prenhes e Não-Prenhes (Tab. 1). Mesmo com a presença do parasita detectada pela qPCR, os parâmetros hematócrito, eritrócitos e hemoglobina dentro dos valores fisiológicos (JAIN, 1993).

Tabela 1. Variáveis hematológicas de novilhas Aberdeen Angus (*Bos taurus*), categorizadas de acordo com diagnóstico de gestação, provenientes de propriedade rural no município de Charqueadas, RS.

Variável	Prenhes (N=47)	Não-prenhes (N=49)	Ref.*	P
Hematócrito (%)	35,9 ± 0,56	37,2 ± 0,43	24 - 46	0,055
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	7,5 ± 0,10	7,7 ± 0,10	5 - 10	0,13
Hemoglobina (g/dL)	12,1 ± 0,15	12,6 ± 0,19	8 - 15	0,07

*Jain, 1993.

Foi considerado significativo $P < 0,05$

Após a recuperação de um quadro de anaplasmosse aguda, os animais permanecem com uma infecção em níveis baixos, muitas vezes não detectados em microscópio (SINGH et al., 2012). Neste contexto, a técnica de qPCR mostra-se uma ferramenta importante na detecção de animais persistentemente infectados dentro do rebanho. No Brasil, a prevalência de *Anaplasma marginale*, analisada

com testes moleculares, pode variar entre 7,5% e 100% de acordo com a época do ano, a presença dos vetores (principalmente o *R. microplus*), e a região do país (RAMOS et al., 2020). Esses dados indicam que grande quantidade de animais pode estar em risco, pois caso o sistema imunológico seja comprometido, a parasitemia pode aumentar, causando quadro clínico no hospedeiro (KOCAN et al., 2010). Ainda, a presença de animais reservatório garante a persistência de hemoparasitas no rebanho e transmissão destes à prole (BRITO et al., 2019). Entretanto, é necessária melhor compreensão sobre o momento no manejo e dia a dia das propriedades em que os níveis de parasitismo podem aumentar e se tornar novamente um risco à saúde dos animais e perdas econômicas para o produtor.

4. CONCLUSÕES

Todas as novilhas foram positivas para *A. marginale* pela técnica de qPCR, mas os parâmetros hematócrito, eritrócitos e hemoglobina estavam dentro dos valores de referência. Não foi possível verificar a influência deste hemoparasita na taxa de concepção das novilhas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, H., ELGHAFGHUF, A., ELSOHABY, I., NASR, M.A. Maternal and non-maternal factors associated with late embryonic and early fetal losses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 100, p. 16-23, 2017.
- BRITO, L. G., BARBIERI, F. D. S., FERREIRA, T. A. A., CARNEIRO, D. D. S., AMARAL, T. M., FIGUEIRÓ, M. R., & OLIVEIRA, M. D. S. Transmissão congênita de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina. **Circular Técnica**, v.48, 2019.
- GIVENS, M.D., MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, p. 270-285, 2008.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J., STEP, D. L., BLOUIN, E. F., COETZEE, J. F., SIMPSON, K. M., ... & BOILEAU, M. J. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis. **The bovine practitioner**, p.93-102, 2010.
- MARANA, E. R. M., DIAS, J. A., FREIRE, R. L., VICENTINI, J. C., VIDOTTO, M. C., & VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 20-26, 2009.
- OLIVEIRA, P. A. D., RUAS, J. L., RIET-CORREA, F., COELHO, A. C. B., SANTOS, B. L., MARCOLONGO-PEREIRA, C., SALLIS, E. S. V. & SCHILD, A. L. Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 797-801, 2017.
- RAMOS, I. A. D. S., MELLO, V. V. C. D., MENDES, N. S., ZANATTO, D. C. D. S., CAMPOS, J. B. V., ALVES, J. V. A., ... & ANDRÉ, M. R. Serological occurrence for tick-borne agents in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n.1, 2020.
- SINGH, H., HAQUE, M., SINGH, N. K., & RATH, S. S. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 1, p. 55-58, 2012.